



Studies on enzymes involving cell wall chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母における細胞壁キチンの生合成に関する酵素に関する研究)

著者	矢部 富雄
号	576
発行年	1998
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15953">http://hdl.handle.net/10097/15953</a>

氏 名(本籍)	矢 部 富 雄 <small>や べ とみ お</small>
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 5 7 6 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	Studies on enzymes involving cell wall chitin synthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母における細胞壁キチンの生合成に関する酵 素に関する研究)
論文審査委員	(主 査) 教 授 中 島 佑 教 授 山 本 徳 男 教 授 神 尾 好 是

# 論文内容要旨

## 序論

真核生物でありながら単純な形態を有する出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、細胞が生育する際の様々なプロセスを比較的容易に理解するためのかっこうの生物である。また一方で、酵母や糸状菌は醸造等の食品利用や医薬品、洗剤等の生産宿主としてその利用価値が高い反面、種によって植物や動物に感染し病原性を有することから、有益と有害という 2 つの側面を持っている。病原真菌の対処には抗真菌剤が用いられるが、真菌の細胞壁は高等動物細胞には存在しないため、細胞壁の主合成系は抗真菌剤の標的として注目を集めている。しかし、そうした細胞壁の生合成機構に関する研究は、いまだ不明な点を多く残しており、その解明にはより詳細な解析が必要である。

出芽酵母の細胞壁は、細胞を保護し細胞形態を規定する以外にも、細胞外界からの刺激や情報を最初に受け取りこれらを細胞内に選択的に伝達するなど、細胞内の多くの生理的機能に関与していることが近年の研究によって明らかにされている。出芽酵母の細胞壁は、 $\beta$ -グルカン、マンナン、キチンといった多糖から構成されている。このうち  $\beta$ -グルカンとキチンの欠損は細胞に致死の表現型を与えることが知られている。その中でもキチンは、細胞壁の重量比が 1% 程であるにも関わらず、その欠失が致死となることから、細胞が生育する際に最も重要な構成要素のひとつであると考えられる。

出芽酵母は、キチン合成酵素 1 (Chs1p)、キチン合成酵素 2 (Chs2p)、キチン合成酵素 3 (Chs3p) と呼ばれる 3 種類のキチン合成酵素を有している。またそれぞれのキチン合成酵素遺伝子を破壊した実験から、Chs1p は損傷を受けたキチンの修復、Chs2p は出芽時の隔壁形成、Chs3p はその他全体的なキチン合成に関与していると考えられている。さらには、キチン合成酵素 2 および 3 の遺伝子を同時に破壊した場合は細胞が致死性を示すことが知られている。そこで本研究では、キチンの生合成機構を明らかにすることを目的として、出芽酵母の 3 種類のキチン合成酵素の中で最も重要であると考えられる Chs2p および Chs3p について、その機能を生化学的および分子生物学的手法によって解析した。

また、キチン生合成酵素の基質である UDP-*N*-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)の生合成に関しては、原核生物で研究が進んでいるが、出芽酵母を含めた真核生物ではいまだその合成酵素が同定されていない。そこで、大腸菌における UDP-GlcNAc 生合成経路の知見をもとに、出芽酵母より UDP-GlcNAc 合成酵素である”UDP-GlcNAc pyrophosphorylase”を同定し、その機能を解析した。

## 第 1 章 出芽酵母キチン合成酵素 2 におけるキチン合成に関与する触媒部位の探索と解析

出芽酵母のキチン合成酵素の研究は、生化学的手法を用いて長年進められてきたが、1986 年に *CHS1* 遺伝子が同定されて以来、分子生物学的手法を用いた研究により急速に発展し、現在では、数多くの生物種からキチン合成酵素遺伝子が同定されている。しかしながら、キチン生合成機構を解明する上で重要な、キチン合成酵素の機能ドメインに関する知見はいまだ多くない。1995 年に共同研究者の Nagahashi らは、Chs2p のアミノ酸配列の中央部に、様々なキチン合成酵素においてよく保存されている領域が存在することを見出した。con1 と名付けられたこの領域内で、よく保存されているアミノ酸をアラニンに置換した部位特異的変異を導入して活性を測定し、触媒に関わる重要なアミノ酸残基を同定した。しかし、con1 のみでは酵素活性を有しないことから、他にも活性に必須な領域が存在する可能性が考えられた。本研究では、con1 以外にキチン合成酵素活性に必須の領域を同定することを試みた。

### 1) キチン合成酵素における新たな保存領域の探索

出芽酵母を含めた真菌類のキチン合成酵素とのアライメントをもとに、con1 領域以外によく保存されている新しい領域を探索した。その結果、Chs1p と Chs2p のファミリーにのみ共通して保存されている新たな保存領域を同定し、この領域を con2 と名付けた(Fig. 1)。

A

```

**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ScChs2p 746:VDIVISLLSTYGLYFFSSLMYLDPWHMFTSSIQYFLTLPAFTCTLQIFAFCNTHDVSWGTKGSTQESKQLSK :817
CaChs1p 560:VSIVVSLSTYGLYTLMSILYLDPWHMFTCSQYFLMIPSYTCTLQIFAFCNTHDVSWGTKGDNPNKEDLSN :631
EnChsAp 761:VNIVVSLSTVGLYFFTSFMYLDPWHMFTSSAQYFALLPSYICTLQCYAFCNTHDVTWGTKGDNVTINIDLGT :832
PbChs2p 779:TYIIVSTLSTVGLYFFMSFLYLDPWHMFTSSIQYFALLPSYICTLQCYAFCNTHDVTWGTKGDNVTINIDLGT :850
NcChs2p 712:TNLIVSVASTLGLYFVMSFLYLDPWHMFTSAIQYFVLLPSYICTLQYAFCNTHDVTWGTKGDNVMRTDLGG :783
RoChs2p 664:RNIIISLCATYVMYFVSSFMFLDPWHMFTSFQYILLSPSYTNVLNYAFCNTHDVSWGTKGDNVTATDLGV :735
PhChs1p 643:RNIIISIVSTYAMYFIASFLFDPWHMFTSFQYIFLSPSYTNVLNYAFCNTHDVSWGTKGDNVTATDLGV :714
RoChs1p 659:RDVIVSVCSTYIMYFVSSLLFLDPWHMFTSLIPYIFMSPSYTNVLNYAFCNTHDVSWGTKGDNVTATDLGV :730
ScChs1p 912:RDIVISLGSTYCLYLISSIIYLPPWHMFTSFQYILLSPSYTNVLNYAFCNTHDVSWGTKG--AMANPLGK :728
AqChsAp 700:ATLIISLLSTYVMMLVVSIIIFLDPWHMFTSFQYLLMPTTYINILNYAFCNTHDVTWGTKGDDKPEK-LPS :770
EnChsCp 715:FSIIVSLGSTYVMWFIASIIIFMDPWHMFTCFQYILLTPTYINVLNYAFCNTHDVTWGTKGDDKAEK-LPS :785
SpChs1p 663:INIVISLSSTYGMYLVSIIISFDPWHMFTSFQYIFLSIMYTNVLNYAFCNTHDVSWGTKGDHFTNNDLGV :734
CaChs2p 802:RDLVVATSSSTYALYFLASFLYFPWHMFTSFQYILLSPSYTNVLNYAFCNTHDVSWGTKG--EVGGKSLGE :872
RcChs1p 656:RNMVISLSSTYGIYLVSSCLHRQPWHMFTSFLPYLLPGYINILNYAFCNTHDVSWGTKGDNVSAKDLGV :727
AfChsCp 687:GIVLIALVSTYGIYIVASIIYMDPWHMFTSFQYLLMPTTYINILNYAFCNTHDVSWGTKGSDKADA-LPS :757
EnChsBp 715:GIIIIAALATFGLYFVASFMYLDPWHMFTSFPAYMAVQSSYINILNYAFSNWHDVSWGTKGSDKADA-LPS :785
AfChsGp 710:GIIIIAALATFGLYFVASFMYLDPWHMFTSFPAYMCVQSSYINILNYAFSNWHDVSWGTKGSDKADA-LPS :780
NcChs3p 716:GVILVALVTIYGLYFLASFMFLDPWHMFTSFPYMYLLMSTYINILNYAFNNWHDVSWGTKGSDKAEA-LPS :786

```

B

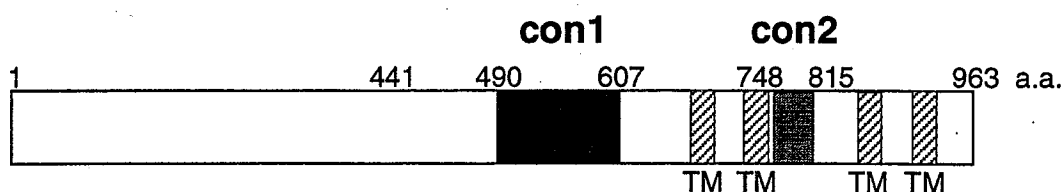
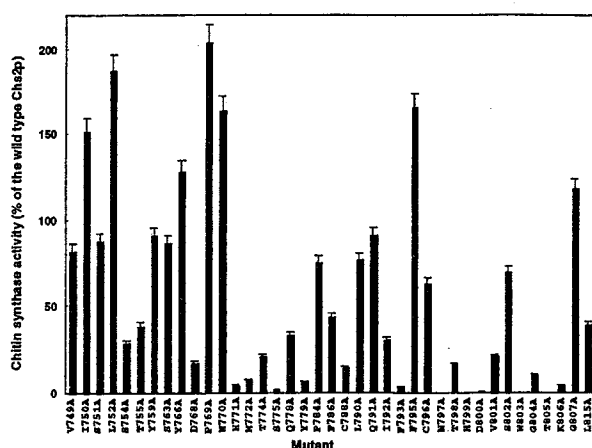


Fig. 1. Highly conserved region of Chs2p.

(A) Comparison of the amino acid sequence of con2 with several chitin synthases. Amino acids that are conserved in all chitin synthases listed here are written in bold characters. Amino acid sequences are aligned using the BLAST and FASTA programs. ScChs1p and 2p, *S. cerevisiae* chitin synthase 1 and 2; CaChs1p and 2p, *Candida albicans* chitin synthase 1 and 2; EnChsAp, Bp, and Cp, *Emericella nidulans* chitin synthase A, B, and C; PbChs2p, *Paracoccidioides brasiliensis* chitin synthase 2; NcChs2p and 3p, *Neurospora crassa* chitin synthase 2 and 3; RoChs1p and 2p, *Rhizopus oligosporus* chitin synthase 1 and 2; PhChs1p, *Phycomyces blakesleeana* chitin synthase 1; AqChsAp, *Ampelomyces quisqualis* chitin synthase A; SpChs1p, *Schizosaccharomyces pombe* chitin synthase 1; RcChs1p, *Rhizomucor circinelloides* chitin synthase 1; AfChsCp and Gp, *Aspergillus fumigatus* chitin synthase C and G. (B) Location of the highly conserved regions of Chs2p. Con1 and con2 represent the highly conserved region of Chs2p located in the middle (con1) and in the C-terminal half (con2) of Chs2p, respectively. Numbers on the upper side of the bar indicate the positions of amino acids from the N-terminal end of Chs2p. TM, putative transmembrane domains.

## 2) 部位特異的変異によるキチン合成酵素活性の測定

Chs2p の活性測定には *CHS2* 遺伝子をガラクトース誘導型のプロモーターによって過剰発現させた酵母細胞を用いた。また、con2 内で他のキチン合成酵素でもよく保存されているアミノ酸を、ODA 法を用いた部位特異的変異によってアラニンに置換した。得られた変異酵素の活性を測定した結果(Fig. 2)、活性が検出限界を下回る変異酵素が同定された。これらの部位については、アラニン以外の類似アミノ酸に置換し、それぞれの変異酵素の活性を測定した。



**Fig. 2. Effects of alanine substitutions for the conserved amino acids in con2 on the activity of Chs2p.**

Conserved amino acids in con2 were substituted for by alanine, and the effect on enzyme activity is shown. Activities of the mutant enzymes were determined in a standard assay mixture using 10 µg of membrane proteins at 30°C for 60 min and are indicated as a percentage of that of the wild type Chs2p.

### 3) 変異酵素の反応動力学的解析

極度に活性が低下した変異酵素について、キネティクスから活性低下の原因を推定した(Table 1)。その結果、変異によって  $K_m$  値には大きな変化が見られないが、触媒効率が大きく低下していることが分かった。さらに、各変異が酵素の発現量には影響を及ぼさないことが、western blotting によって確認された。このことは、変異によって著しく活性が低下したアミノ酸残基が、直接触媒に関与するアミノ酸残基である可能性を示唆している。

**Table 1. Characteristics of the mutant Chs2p**

Mutant	Relative activity %	$K_m$ <sup>1)</sup> mM	$k_{cat}$ <sup>2)</sup> min <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
Wild Type	100.0	0.71	10.89	15.34
F793A	3.7	0.94	1.33	1.41
F793Y	137.3	0.61	8.73	14.31
N797A	0.1	0.95	0.11	0.12
N797Q	13.4	0.46	0.53	1.15
N797D	<0.1	N.A. <sup>3)</sup>	N.A.	N.A.
H799A	<0.1	N.A.	N.A.	N.A.
H799D	2.2	0.94	0.41	0.44
H799K	0.1	4.91	0.06	0.01
H799R	<0.1	N.A.	N.A.	N.A.
D800A	0.3	0.63	0.26	0.41
D800E	<0.1	N.A.	N.A.	N.A.
D800N	0.1	3.84	0.02	<0.01
W803A	<0.1	N.A.	N.A.	N.A.
W803Y	<0.1	N.A.	N.A.	N.A.
G804A	10.3	0.35	0.91	2.60
G804S	<0.1	N.A.	N.A.	N.A.
T805A	0.1	1.82	0.08	0.04
T805S	<0.1	N.A.	N.A.	N.A.
K806A	4.9	0.99	0.72	0.73
K806R	15.8	0.40	0.14	0.34

1) Concentrations of the substrate used for the analysis ranged from 0.218 mM to 4.168 mM.

2) The initial rates of each mutant were determined to calculate the  $k_{cat}$  values.

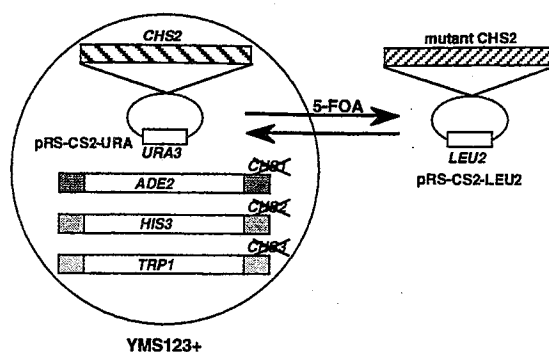
3) N.A., not applicable due to low activities.

### 4) 変異酵素の *in vivo* における成育相補性の検討

*in vitro* において活性が低下している変異酵素は、*in vivo* においても機能が損なわれている可能性を検討した。3 種類すべてのキチン合成酵素を欠損している株に、変異酵素遺伝子を含む centromeric plasmid を導入した場合、細胞が成育できるか否かを調べた(Fig. 3)。その結果、*in vitro* で活性が低下した

酵素は、*in vivo* でキチン合成酵素を欠如した細胞の成育を相補しなかったことから、*in vitro* における酵素活性の低下が *in vivo* におけるキチン合成にも反映されていることが明らかとなった。

#### A) Strategy



#### 5) Chs3p グループにおける con2 領域の検索

ホモロジー検索では、con2 のアミノ酸配列は Chs3p ファミリーに属する酵素に相同性が認められなかったが、活性中心部位と考えられるアミノ酸残基について、改めてアライメントを試みた。その結果、触媒に重要と思われる

con2 内のアミノ酸残基は、Chs3p ファミリーに属する酵素の C-末端領域にもよく保存されていることが確認された (Fig. 4)。

#### 6) 変異酵素による生成産物の検討

ここで用いているキチン合成酵素の活性検出法では、

産物をフィルターにトラップしてその生成量を測定するため、鎖長の短いキ

#### B) Rescue of the CHS2-deficient cells

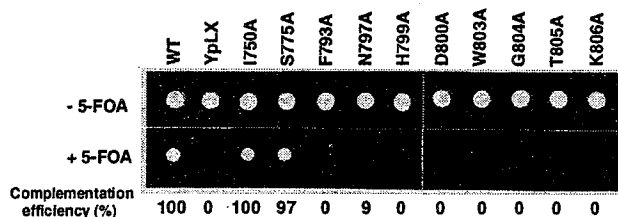


Fig. 3. Rescue of the CHS2-deficient cells by the mutant CHS2 genes.

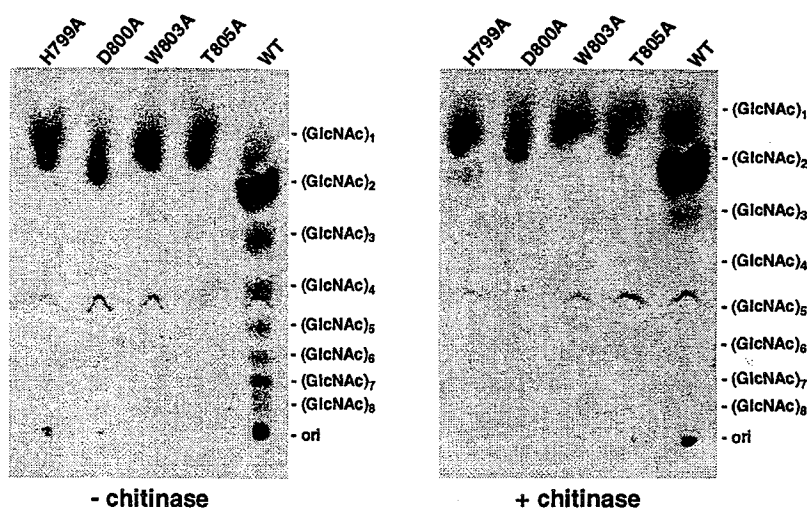
(A) The strategy to test the function of the mutant CHS2 genes in vivo was shown. (B) The cells of YMS123<sup>+</sup> that had been transfected with pRS-CS-LEU carrying the wild type or the indicated mutant CHS2 gene were further cultured on plates with (+ 5-FOA) or without (- 5-FOA) 5-FOA at 30°C for 3 days. Complementation efficiency represents the percentage of clones that grew in the presence of 5-FOA among 68 clones tested. Note that all the clones used in this study grew in the absence of 5-FOA.

<b>ScChs2p</b>	775:	SSIQYFLTLPAFTCTLQIFAFNCNT	<b>HDVSWG</b>	-TKGSTQ	: 810
<b>ScChs3p</b>	1086:	WMCVYICALPIWNFVLPSYAYWK	<b>DDFSWGD</b>	TRTIAG	: 1122
<b>CaChs3p</b>	1058:	YFVIYLFALPIWNFVLPSYAYWK	<b>DDFSWGET</b>	RTVAG	: 1094
<b>NcChs4p</b>	1082:	WMFIYLLSLPWNFVLPTAYAFWK	<b>DDFSWGD</b>	TRKTAG	: 1118
<b>EnChsEp</b>	1004:	WMLVYLISLPIWNFVLPTAYAFWK	<b>DDFSWGD</b>	TRKTAG	: 1040
<b>MgChs4p</b>	1118:	WMLIYLLSLPWNFVLPAYAFWK	<b>DDFSWGD</b>	TRKTAG	: 1154
<b>UmChs5p</b>	1110:	WMLIYLLSLPWNFVLPLYAYWH	<b>DDFSWGA</b>	TRVVQG	: 1146
<b>FnChs1p</b>	890:	WMLVYLLALPIWNFVLPLYAYWH	<b>DDFSWGET</b>	RRVEG	: 926
<b>EnCsmAp</b>	1656:	WMIYILAIPLVYSLALPLYSFWH	<b>DDFSWGN</b>	TRIITG	: 1692
<b>EnChsDp</b>	1298:	WMIYILAIPLVYSLALPLYSFWH	<b>DDFSWGN</b>	TRIITG	: 1334
<b>UmChs6p</b>	825:	WLVYILAYPVFSFPLPIYSFWH	<b>DDFSWGN</b>	TRIVVG	: 861

Fig. 4. Comparison of the amino acid sequences of con2 and Chs3p.

A part of the amino acid sequence of the Chs2p con2 was compared with those of Chs3p and its homologs in other organisms. Amino acids that are conserved in all chitin synthases listed here are written in bold characters, and those considered to be the catalytic residues are marked by \*. Amino acid sequences were aligned by eyes. ScChs2p and 3p, *S. cerevisiae* chitin synthase 2 and 3; CaChs3p, *C. albicans* chitin synthase 3; NcChs4p, *N. crassa* chitin synthase 4; EnChsDp, Ep, and CsmAp, *E. nidulans* chitin synthase D, E, and chitin synthase with a myosin motor-like domain A; MgCh4p, *Magnaporthe grisea* chitin synthase 4; UmChs5p and 6p, *Ustilago maydis* chitin synthase 5 and 6; FnChs1p, *Filobasidiella neoformans* chitin synthase 1.

チン(オリゴ糖)が生産された場合、フィルターにトラップされずその生成産物を検出することが出来ないため、変異酵素が短鎖のオリゴ糖を生成する能力を保持している可能性を否定できない。そこで、活性を失っている



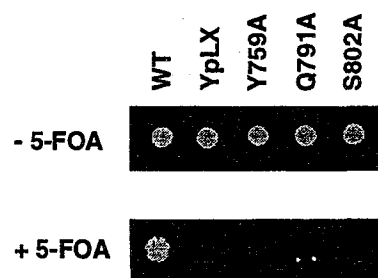
**Fig. 5. Analysis of the products of the wild type and the mutant Chs2 proteins.**

Twenty microgram proteins of the membranes from the cells overexpressing the wild type and the mutant Chs2 proteins were incubated at 30°C for 60 min. Reaction products of the indicated proteins were separated by silica gel thin layer chromatography before (- chitinase) or after (+ chitinase) chitinase treatment, and visualized by an image analyzer. The position of the standard GlcNAc oligomers are indicated.

変異酵素が実際に短鎖のオリゴ糖を生成する能力まで失っているのかどうかを、TLCを用いて調べた。その結果、触媒に直接関与すると考えられる con2 内のアミノ酸に変異が入った場合、鎖長の短いものも含めてまったくキチンが合成されていないことが確かめられた(Fig. 5)。以上の結果より、以前 con1 で同定した以外に、新たに触媒反応に関与すると考えられる 4 つのアミノ酸残基が同定された。

## 7) キチン合成酵素の *in vivo* におけるキチン合成に必須のアミノ酸残基の発見

アラニンスキャンを行った変異酵素の中で、酵素活性を保持しているにも関わらず、キチン合成酵素を 3 種類とも欠損した変異株中の成育を相補しない変異酵素を、3 種類発見した(Fig. 6)。 *in vitro* での変異酵素のキネティクスからは変異酵素の性質に大きな変化は認められなかった。



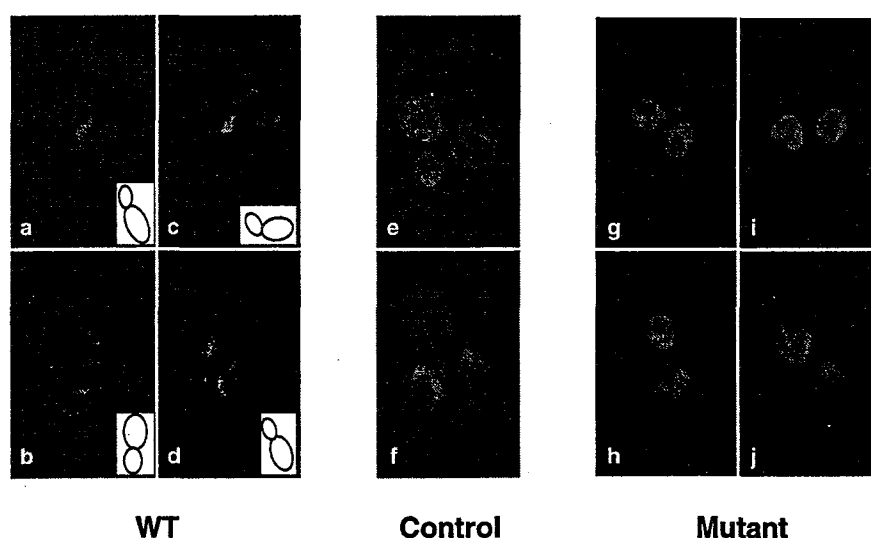
**Fig. 6. Rescue of the *CHS2*-deficient cells by the mutant *CHS2* genes.**

The cells of YMS123<sup>+</sup> that had been transfected with pRS-CS-LEU carrying the wild type or the indicated mutant *CHS2* gene were further cultured on plates with (+ 5-FOA) or without (- 5-FOA) 5-FOA at 30°C for 3 days. Note that all the clones used in this study grew in the absence of 5-FOA.



## 8) 変異酵素の局在性の検討

*in vitro* において変異酵素の活性は正常に検出されることから、*in vivo* でこれらの変異酵素が機能できない可能性の一つとして、出芽部位に局在するキチン合成酵素の局在性が失われることが考えられる。そこで、オワンクラゲ由来 GFP (Green Fluorescent Protein) との融合タンパク質を発現させ、その局在部位を調べた (Fig. 7)。その結果、これらの変異酵素では酵素の出芽部位への局在性が失われていた。したがって、これらのアミノ酸残基は、Chs2p を出芽部位へと直接的に輸送するタンパク質か、あるいは輸送されるための適切な conformation を維持するのに必要なタンパク質との結合部位である可能性が示唆された。



**Fig. 7. Localization of GFP-Chs2p in wild-type and mutated cells.**

Cells carrying GFP-Chs2p, GFP-mChs2p, and GFP, which are detected in the fluorescein channel, were cultured for 16 h at 23°C and fixed with a 1% low-melt agarose. They were observed by confocal laser scanning microscope.

## 第 2 章 キチン合成酵素 3 の活性化を制御するタンパク質の機能の解析

出芽酵母の 3 種類のキチン合成酵素の中で、アミノ酸の推定 1 次構造が他の二つとは比較的異なっている Chs3p は、単独の過剰発現では酵素活性が増加しない。このことから、キチン合成酵素 3 の活性化には活性制御タンパク

質が別に関与していることが推定された。Kawamoto らによってクローニングされた *SKT5* 遺伝子は、その欠損株の表現型が *CHS3* 遺伝子欠損株に類似していることから、Chs3p によるキチン合成に何らかの形で関与をしている可能性が考えられた。現在、*SKT5* 遺伝子は酵母のゲノム塩基配列決定によって *CHS4* と命名されている。

## 1) Chs4p の過剰発現によるキチン合成酵素 3 活性への影響

Chs4p の Chs3p の活性化について検討するため、*CHS4* 遺伝子をガラクトースで誘導可能な *GAL1* プロモーターの下流に導入して過剰発現した。その結果、Chs4p の過剰発現によって Chs3p の活性の増大が認められた(Fig. 8)ことから、*CHS4* 遺伝子は Chs3p 活性を正に制御するタンパク質をコードする遺伝子であることが示された。

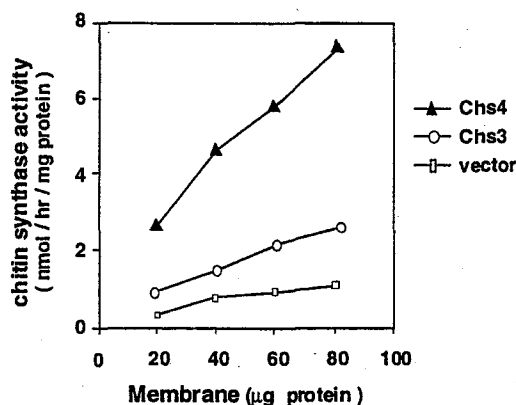


Fig. 8. Increase in the activity of Chs3p by the overexpression of Chs4p.

Chs3p activities in the cells overexpressing Chs4p (triangle), Chs3p (circle) or none (square) were determined in a standard assay mixture using 20-, 40-, 60-, or 80- μg of membrane proteins at 30°C for 60 min.

## 2) *CHS4* 遺伝子の欠損による細胞への影響

次に Chs4p の *in vivo* の機能を検討する目的で、*CHS4* 遺伝子の欠損

株を作製した。Calcofluor 欠損株はカルコフラワーホワイトに対し

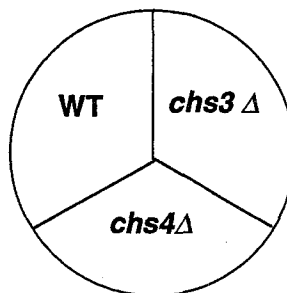
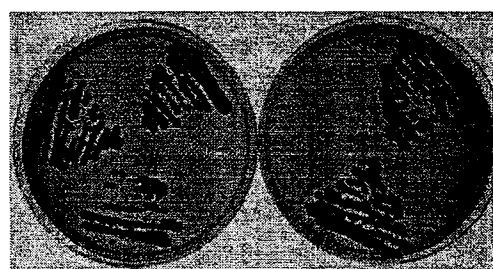
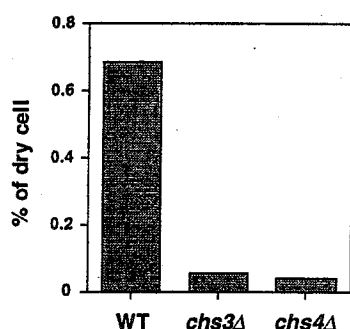


Fig. 9. Resistance to Calcofluor white of the *chs3Δ* and *chs4Δ* null mutants.

Cells of the wild-type, *chs3Δ*, or *chs4Δ* were streaked on YPD agar plates in the presence (+) or absence (-) of Calcofluor white (1 mg/ml) and incubated for 24 h at 30°C.

て耐性度が増加しており、野生株が感受性を示す 1 mg/ml の濃度のカルコフラワーホワイトを含む培地中でも生育した(Fig. 9)。カルコフラワーホワイト

は、細胞壁中のキチンに結合することによって細胞の成育を阻害することから、*CHS4* 遺伝子の欠損はキチンの合成量の減少を引き起こすと考えられる。そこで、欠損株のキチン含量を測定したところ、*CHS4* 遺伝子欠損株では野生株の 10%程度にまでキチン量が減少していた(Fig. 10)。以上より、Chs4p は Chs3p の活性を正に制御するタンパク質であり、細胞内で実際にキチン合成に関与していることが示された。

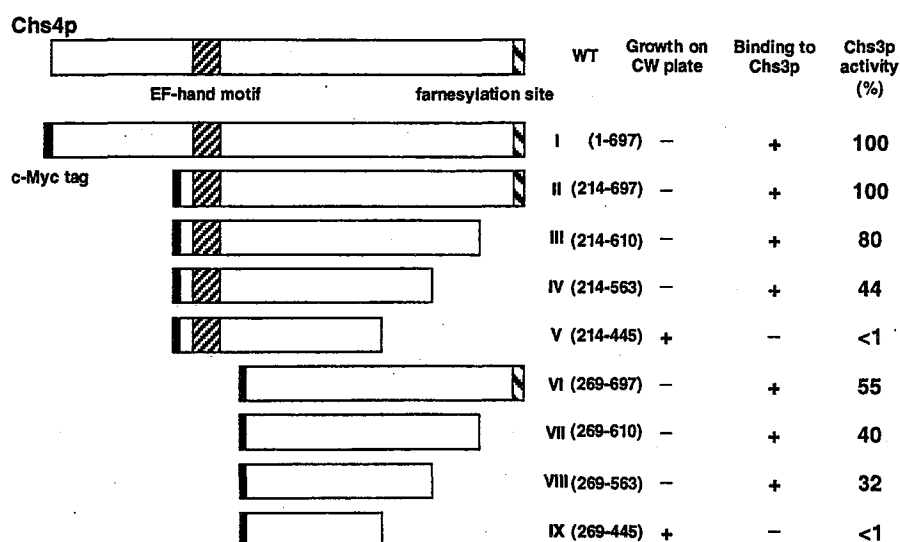


**Fig. 10. Decreased chitin contents in the *chs3Δ* and *chs4Δ* null mutants.**

Cell wall chitin contents of wild-type, *chs3Δ*, or *chs4Δ* were estimated by determining the amount of amino sugars in the resulting hydrolysate with Elson-Morgan method, using N-acetylglucosamine as a standard.

### 3) Chs3p と Chs4p の interactive region の探索

これまでに Pringle らによって Chs3p と Chs4p は同様の細胞内局在性を示すことが明らかにされている。そこで、実際に Chs3p と Chs4p が結合しているか否かを、yeast two hybrid 法によって解析した(Fig. 11)。その結果、Chs4p



**Fig. 11. Region of Chs4p, that is required for the activation of and binding to Chs3p.**

Boxes represent fragments of Chs4p. These fusions were tested for interaction with Chs3p and activation of Chs3p. Binding to Chs3p was assigned as + and - represent the ability and inability of Chs4p fragment to bind to Chs3p, respectively. Growth on CW plate was indicated with viable (+) for YPD plate including Calcofluor white (1 mg/ml) or lethal (-). Chs3p activities were detected in a standard assay mixture using 20 μg of membrane proteins at 30°C for 60 min and are indicated as a percentage of that of the wild type Chs3p.

は Chs3p と結合する能力を有することが明らかとなった。また、Chs4p のアミノ酸残基 445 から 563 番目の領域のみで Chs3p と結合することから Chs4p に存在する EF-hand motif や C-末端の farnesyl site は Chs3p の結合には必要とされないことが示された。さらに Chs4p のアミノ酸残基の 445 から 563 番目の領域のみで Chs3p の活性を低下させ、また *CHS4* 遺伝子欠損株のカルコフラワーホワイトの耐性を誘導することから、Chs4p は Chs3p に結合することによって Chs3p を活性化させることを強く示唆している。

### 第 3 章 キチン合成酵素の基質・UDP-GlcNAc の生合成に関わる酵素の解析

キチン合成酵素の基質である UDP-GlcNAc は、その最終ステップで GlcNAc-1-phosphate と UTP から UDP-GlcNAc pyrophosphorylase によって合成される。大腸菌などのバクテリアではすでに UDP-GlcNAc pyrophosphorylase 遺伝子が同定されているが、出芽酵母をはじめとする真核生物においては、いまだその酵素遺伝子は同定されていない。キチン合成酵素の基質の生合成機構の解明もまたキチン生合成機構を知る上で重要であり、したがって真核生物より UDP-GlcNAc pyrophosphorylase 遺伝子のクローニングを行った。

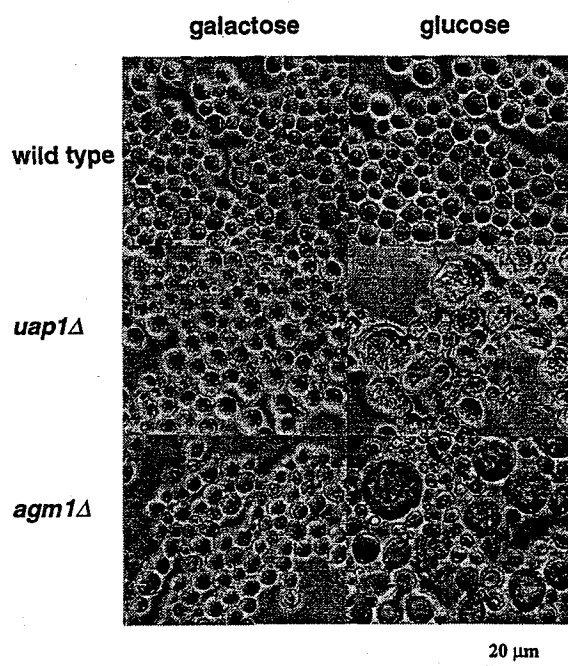
#### 1) UDP-GlcNAc pyrophosphorylase のクローニング

出芽酵母で既に同定されている pyrophosphorylase ファミリーに属する酵素、Gal7p (UDP-Gal)、Ugp1p (UDP-Glc)、Vig9p (GDP-Man)、によく保存されている  $[L(X)_2GXGTXM(X)_4PK]$  というアミノ酸配列をもとに、ゲノムデータベースを検索した結果 *YDL103C* 産物がこのアミノ酸配列モチーフを有していることが判明した。そこで、ゲノム DNA をテンプレートとして PCR によって *YDL103C* を得、これを *UAP1* (UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase) と名付けた (Fig. 12)。また、出芽酵母の *UAP1* (*ScUAP1*) をプローブとして、真菌の *Candida albicans* ゲノム DNA ライブラリーとヒトの精巣由来 cDNA ライブラリーからクローニングし、それぞれ *CaUAP1*、*HsUAP1* と名付けた (Fig. 12)。



### 3) *UAP1* 遺伝子発現産物の機能の検討

出芽酵母において *UAP1* 遺伝子欠損株(*uap1Δ*)を作製したところ、致死性を示したことから、*UAP1* 遺伝子は酵母の成育に必須の遺伝子であることが示された。また、ガラクトースで誘導が可能な *GAL1* プロモーターの下流に *UAP1* 遺伝子を導入したプラスミドを作製し、*uap1Δ*株を形質転換して細胞の形態を観察した結果、GlcNAc-1-P と GlcNAc-6-P の interconversion をつかさどる *AGM1* (phosphoacetylglucosamine mutase)遺伝子の欠損株と同様の、細胞壁に異常をきたしたと考えられる形態を示した(Fig. 14)。この結果は、Uap1p と Agm1p によって合成される UDP-GlcNAc が主に細胞壁のキチン合成に用いられていることを示している。



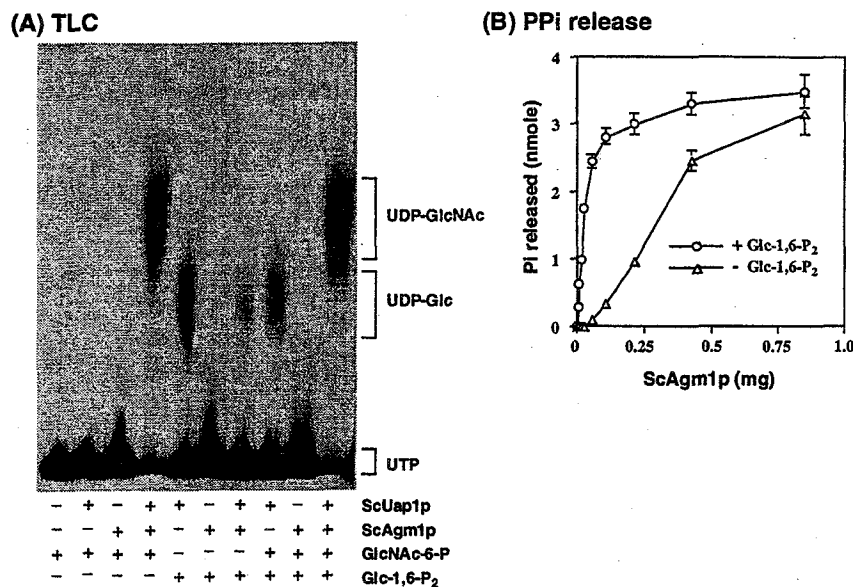
**Fig. 14. Aberrant morphology caused by the depletion of *ScUAP1*.**

*S. cerevisiae* cells of the wild type, *uap1Δ* harboring pYEU-*ScUAP1*, and *agm1Δ* harboring pYEU-*ScAGM1* were spread on agar plates containing galactose or glucose and incubated at 30°C. Photographs were taken at 24 hr.

### 4) GlcNAc-6-P からの UDP-GlcNAc 合成系の再構築

真核生物では GlcNAc-1-P と GlcNAc-6-P の interconversion に引き続いて GlcNAc-1-P の uridylation が起こると考えられているが、この仮説が正しいければ Agm1p と Uap1p の存在下で GlcNAc-6-P から UDP-GlcNAc が合成されるはずである。そこで検討した結果、Agm1p と Uap1p が共存するときのみ GlcNAc-6-P から UDP-GlcNAc が生成された(Fig. 15)。また Uap1p は GlcNAc-1-P のみを基質としたことから、生成の順序は uridytransfer が先ではなく、6

位から 1 位へのリン酸の interconversion が先に起きていることが明らかとなった。さらに、Glc-1,6-P の効果を調べたところ、Uap1p による UDP-GlcNAc の生成に必須のものではないが、過剰に存在するとき Agm1p の活性に対してエンハンサーとしての効果があることが判明した。



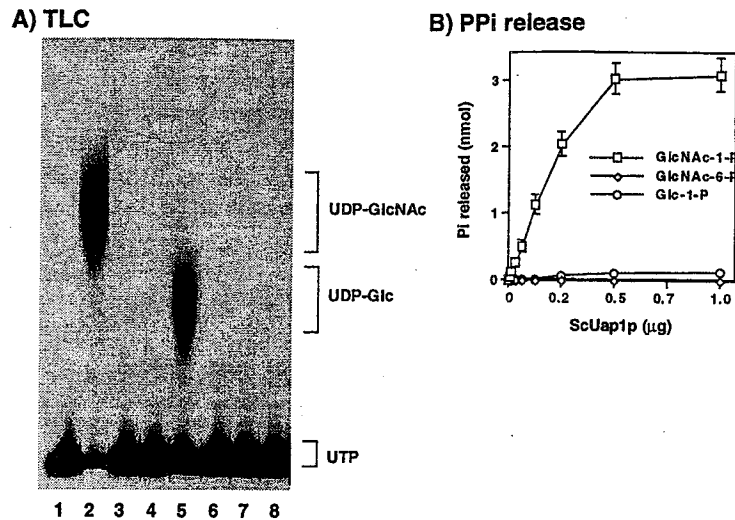
**Fig. 15. Production of UDP-GlcNAc from GlcNAc-6-P by ScUap1p and ScAgm1p.**

(A) Approximately 0.1  $\mu\text{g}$  of the purified GST-ScUap1p (ScUap1p) was incubated with [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]UTP and 20  $\mu\text{M}$  each of the indicated sugar nucleotides in the presence or absence of approximately 0.1  $\mu\text{g}$  of the purified GST-ScAgm1p. The reaction products were separated by PEI cellulose thin layer chromatography (TLC) and visualized by autoradiography. The positions of the UDP-GlcNAc, UDP-Glc, and UTP that were visualized under UV light are indicated. It should be noted that UDP-Glc, which appeared in the presence of ScUap1p and Glc-1,6- $\text{P}_2$ , was formed from a trace of Glc-1-P in the Glc-1,6- $\text{P}_2$ . (B) The indicated amounts of the purified GST-ScAgm1p were incubated with approximately 0.1  $\mu\text{g}$  of the purified GST-ScUap1p, GlcNAc-6-P, and UTP in the presence (circle) or absence (triangle) of 20 mM of Glc-1,6- $\text{P}_2$ . The amounts of the released inorganic phosphate that represent the enzyme activities were determined with malachite green and ammonium molybdate.

### 5) pyrophosphorylase の基質特異性の検討

次に ScUap1p の基質特異性を検討した。ScUap1p と GlcNAc-1-P、GlcNAc-6-P、GlcN-1-P、Glc-1-P、Gal-1-P、GalNAc-1-P、Man-1-P をそれぞれインキュベートした場合、GlcNAc-1-P 以外に Glc-1-P も基質として使用可能であることが分かった(Fig. 16)。しかし Uap1p の Glc-1-P に対する  $K_m$  値は、GlcNAc-1-P に比べ非常に高く、さらに *in vivo* においては、Glc-1-P を基質として UDP-Glc を生成する酵素をコードする *UGP1* 遺伝子の欠損株の成育を相補することは出来なかったことから、生体内では Uap1p が UDP-Glc 合成にも関与している可能性は少なく、Uap1p は主に UDP-GlcNAc 合成にのみ必要とされていると

思われる。



**Fig. 16. Substrate specificity of ScUap1p.**

(A) Approximately 0.1 μg of the purified GST-ScUap1p was incubated with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]UTP and 20 μM of each sugar nucleotide. The reaction products were separated by PEI cellulose thin layer chromatography (TLC) and visualized by autoradiography. The positions of the UDP-GlcNAc, UDP-Glc, and UTP that were visualized under UV light are indicated. Lane 1; none, lane 2; GlcNAc-1-P, lane 3; GlcNAc-6-P, lane 4; GlcN-1-P, lane 5; Glc-1-P, lane 6; Gal-1-P, lane 7; GalNAc-1-P, lane 8; Man-1-P. (B) The indicated amounts of the purified GST-ScUap1p were incubated with 20 μM of the indicated nucleotide sugar, UTP, and pyrophosphatase. The amounts of the released inorganic phosphate that represent the enzyme activities were determined with malachite green and ammonium molybdate.

## 6) ScUap1p の活性中心部位の探索

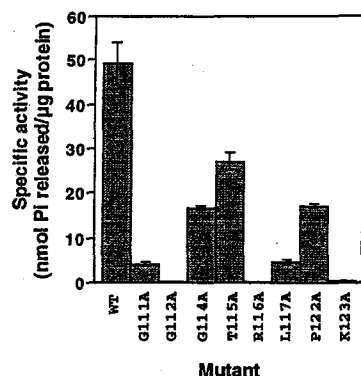
Uap1p の活性中心を  
同定する目的で、Uap1p  
を構成するアミノ酸残  
基の中で他の UDP-sugar  
pyrophosphorylase にも  
よく保存されているア  
ミノ酸残基(Fig. 17)が、  
触媒反応に関与してい  
るか否かを、部位特異  
的変異によるアラニン  
スキャンによって検討

		++ +++++		++
ScUap1p	105:	AVILMAGG <b>Q</b> Q <b>T</b> RLGSSQ---	<b>F</b> KGCYDIGLPS	:132
CaUap1p	105:	AVLLMAGG <b>Q</b> Q <b>T</b> RLGSSA---	<b>F</b> KGCFNIELPS	:132
HsUap1p	104:	AVLLLAGG <b>Q</b> Q <b>T</b> RLGVAY---	<b>F</b> KGMYDVGLPS	:131
EcGlmUp	7:	SVVILAAG <b>K</b> G <b>T</b> RMYSDL---	<b>F</b> KVLHTLAGKA	: 34
ScUgplp	105:	AVLKLNG <b>G</b> L <b>G</b> TSMGCVG---	<b>F</b> KSVIEVREGN	:132
HsUgplp	108:	VVVKLNG <b>G</b> L <b>G</b> TSMGCKG---	<b>F</b> KSLIGVRNEN	:136
EcUgplp	11:	AV-IPVAG <b>L</b> G <b>T</b> RMLPATKAI <b>F</b> K	EMLPLVDKP	: 40
ScVig9p	2:	KGLILV <b>G</b> Y <b>G</b> TRRLRPLTLTV <b>F</b> K	PLVEFGNRP	: 32

**Fig. 17. Comparison of the amino acid sequences of UDP-sugar pyrophosphorylases.**

Amino acid sequences of ScUap1p are compared with those of other UDP-sugar pyrophosphorylases using the FASTA and BLAST programs. Identical amino acids among all the proteins listed here are indicated by bold letters. Amino acids that were replaced by alanine are marked by +. ScUap1p; *S. cerevisiae* UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, CaUap1p; *C. albicans* UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, HsUap1p; *H. sapiens* UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, ScUgplp; *S. cerevisiae* UDP-Glc pyrophosphorylase, EcGlmUp; *E. coli* UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, HsUgplp; *H. sapiens* UDP-Glc pyrophosphorylase, EcUgplp; *E. coli* UDP-Glc pyrophosphorylase, ScVig9p; *S. cerevisiae* GDP-Man pyrophosphorylase.





**Fig. 18. Effects on ScUap1p activity of alanine substitution for the conserved amino acids.**

The ScUap1 mutant proteins harboring an alanine substitution for each of the amino acids that are highly conserved in UDP-sugar pyrophosphorylases were expressed as a fusion with GST and purified with glutathione Sepharose beads. Approximately 0.1 μg of the purified GST and the indicated mutant proteins were incubated with GlcNAc-1-P and UTP, and the amounts of the released inorganic phosphate that represent the enzyme activities were determined with malachite green and ammonium molybdate.

した。その結果、G112A、R116A、K123A のそれぞれの変異株では活性がほとんど検出されなかった (Fig. 18)。また、それぞれの変異株の GlcNAc-1-P に対するキネティクスから、G112A の  $K_m$  値に大きな変化が見られた。また、これ

**Table 2. Characteristics of the mutant ScUap1p**

Mutant	$K_m$ μM	$k_{cat}$ min <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ μM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	$K_m$ to UTP μM
Wild type	13.52	925.18	68.41	20.58
G111A	33.57	80.05	2.38	44.67
G112A	124.20	1.06	0.01	71.36
G114A	19.37	318.62	16.45	24.57
T115A	15.06	526.54	34.95	23.28
R116A	10.92	0.90	0.08	16.72
L117A	29.33	136.31	4.65	54.03
P122A	11.78	264.18	22.44	30.73
K123A	18.49	5.09	0.28	17.62

The  $K_m$  and  $k_{cat}$  values of the wild type and mutant enzymes to GlcNAc-1-P were determined from the amounts of pyrophosphate released from UTP. The  $K_m$  values to UTP were also indicated in the right column

ら 3 つのアミノ酸残基のアラニンへの置換はいずれも  $k_{cat}$  値を激減させた (Table 2)。さらに、この 3 つの変異酵素によって *uap1* 欠損株の育成を相補することは出来なかったことから、Gly<sup>112</sup>、Arg<sup>116</sup>、Lys<sup>123</sup> は ScUap1p において触媒に関わる重要なアミノ酸残基であり、特に Gly<sup>112</sup> は基質の結合に関与する残基であると推定した。

## 総合考察

出芽酵母のキチン合成酵素 2 を用いた実験により、すべてのキチン合成酵素に保存されている con2 領域は、既に触媒に関与する残基として同定されているアミノ酸を含む con1 領域に加えて、酵素の活性に重要な部位であることを示した。特に Asp<sup>800</sup>、Trp<sup>803</sup>、Thr<sup>805</sup> の各アミノ酸残基は、活性発現に非常に重要であるばかりでなく Chs3p のファミリーにも保存されていることから、酵素の活性中心を構成する残基であると予想される。また、Ala への置換で活性を大きく減少させた His<sup>799</sup> は、Chs3p のファミリーでは Asp として保存

されていることから、キチン合成酵素に共通した必須のアミノ酸残基ではないが、Asp<sup>800</sup> に隣接したアミノ酸としての何らかの重要な役割があるのではないかとと思われる。また、con1 と con2 は両方とも酵素の細胞質ドメインに存在することから con1 と con2 が細胞質内で active pocket を構成しているものと思われる。

一方、Chs1p および Chs3p が出芽部位に局在する機構として、End4p、Chs5p、Myo5p、Chs6p といったタンパク質と作用し chitosome と呼ばれる小胞を経由して出芽部位に移行することが知られている。これに対し Chs2p は、chitosome によらず分泌小胞による輸送経路によって出芽部位に移行されと考えられている。しかし、Chs2p は細胞周期依存的に合成され、そして細胞分裂(出芽終了)以降速やかに分解されることから、Chs2p に付随しその fate を決定するタンパク質の存在が予想できる。今回、GFP と Chs2p の融合タンパク質を製作して、S802A 変異酵素の *in vivo* における局在を調べた結果、Chs2p の出芽部位への局在性が喪失していたことは、このアミノ酸残基との interaction によって出芽部位に Chs2p を局在させるタンパク質が存在していることを示唆しているのかもしれない。

様々な研究者により、これまでキチン合成酵素 3 (CSIII)の活性化に必要な因子として Chs4p が候補に挙げられていたが、本研究によって実際に Chs3p の活性化には Chs4p との結合が重要であることが明らかとなった。さらに Chs3p の活性化に必要な Chs4p の領域を同定した。今後、Chs4p による CSIII のキチン合成酵素活性の制御機構のさらに詳細な解析が望まれる。

これまで真核生物においては研究が進んでいなかった UDP-GlcNAc pyrophosphorylase 遺伝子を、出芽酵母 *S. cerevisiae* と *C. albicans*、さらにヒトで同定した。その結果、バクテリアでは *GlmU* 遺伝子産物に UDP-GlcNAc pyrophosphorylase と GlcN-phosphate *N*-acetyltransferase の両活性が存在するのに対して、真核生物では Uap1p に GlcN-phosphate *N*-acetyltransferase 活性が存在しないことから、UDP-GlcNAc pyrophosphorylase と GlcN-phosphate *N*-acetyltransferase は別々のポリペプチドに存在することが判明した。また、*HsUAP1* はホモロジー検索の結果、男性生殖不能症患者の血中に存在する抗体をコードする *AGXI* と同一であることが分かった。*UAP1* 遺伝子と男性生

殖不能症との関連は、今後の研究を待たなければならないが、この発見は UDP-GlcNAc 生合成とヒトの疾患との新たな関連を示唆している。さらに、出芽酵母において *UAP1* は成育に必須の遺伝子であることから、抗真菌剤の新たなターゲットに成り得ると考えられる。

UDP-sugar transferase に共通して保存されているアミノ酸のうち、*ScUAP1* において Gly<sup>112</sup>、Arg<sup>116</sup>、Lys<sup>123</sup> が活性中心を構成するアミノ酸残基であることが示唆された。このうち、Gly<sup>112</sup> はキネティクスから GlcNAc-1-P との結合部位であることが予想された。1997 年に Flores-Diaz によって、ヒトの UDP-Glc pyrophosphorylase においてもまた Gly が基質との結合部位であることが指摘されていることから、この Gly は基質の UDP-sugar との結合に必要な残基として広く保存されていると考えられる。

## 要約

- 1) キチン合成酵素 2 のアミノ酸配列をもとに、種を超えてキチン合成酵素に普遍的に保存されていると考えられる触媒に重要なアミノ酸残基を、これまで同定されていたものに加えて、新たに 4 残基同定した。
- 2) 新たに同定された活性発現に重要な領域(con2)内に、Chs2p の出芽部位への局在性に関与している残基があることを見出した。
- 3) キチン合成酵素 3 の活性化に必須な要因である Chs4p の領域を同定し、Chs3p との interaction によって Chs3p を活性化させることを明らかにした。
- 4) キチン合成酵素の基質となる UDP-GlcNAc を合成する UDP-GlcNAc pyrophosphorylase を真核生物である *S. cerevisiae*、*C. albicans*、そしてヒトより初めてクローニングし、またその触媒に関与するアミノ酸残基を同定した。

## 原著論文

1. Yabe T., Yamada-Okabe T., Nakajima T., Sudoh M., Arisawa M., and Yamada-Okabe H. : Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*; Identification of additional amino acid residues involved in catalysis.

*Eur. J. Biochem.*, in press., 1998

2. Yabe T., Nakajima T., Arisawa M., and Yamada-Okabe H. : Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*; Identification of amino acid residues concerned with the localization to the bud site. Manuscript in preparation.
3. Ono N., Yabe T., Sudoh M., Nakajima T., Arisawa M., and Yamada-Okabe H. : The yeast Chs4p elicits the trypsin-sensitive and detergent-extractable activity of chitin synthase 3 through protein-protein interaction. Manuscript in preparation.
4. Mio T., Yabe T., Arisawa M., and Yamada-Okabe H. : The eukaryotic UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14392-14397, 1998

## 参考論文

1. Kasahara S., Yamada H., Mio T., Shiratori Y., Miyamoto C., Yabe T., Nakajima T., Ichishima E., and Furuichi Y. : Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits  $\beta$ -glucan synthesis. *J. Bacteriol.*, **176**, 1488-1499, 1994
2. Yabe T., Yamada-Okabe T., Kasahara S., Furuichi Y., Nakajima T., Ichishima E., Arisawa M., and Yamada-Okabe H. : *HKR1* encodes a cell surface protein that regulates both cell wall  $\beta$ -glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **178**, 477-483, 1996
3. Mio T., Yabe T., Sudoh M., Satoh Y., Nakajima T., Arisawa M., and Yamada-Okabe H. : Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **178**, 2416-2419, 1996
4. Mio T., Yamada-Okabe T., Yabe T., Nakajima T., Arisawa M., and Yamada-Okabe H. : Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* *KRE6* and *SKN1* : Expression and physiological function. *J. Bacteriol.*, **179**, 2363-2372, 1997
5. Mio T., Adachi-Shimizu M., Tachibana Y., Tabuchi H., Inoue S. B., Yabe T., Yamada-Okabe T., Arisawa M., Watanabe T., and Yamada-Okabe H. : Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSC1/FKS1* and its involvement in  $\beta$ -1,3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.*, **179**, 4096-4105, 1997

## 論文審査結果要旨

出芽酵母の細胞壁は、三種の多糖すなわち  $\beta$ -グルカン、マンナン、キチンから成っている。その中でもキチンの欠損は細胞の成育阻止につながることから、酵母にとって重要な細胞壁構成要素と考えられる。

出芽酵母のキチン生合成に関しては、三種類の合成酵素、キチン合成酵素 1, 2, 3 が知られている。本研究は出芽酵母のキチン合成機構を解明することを目的として、上記三種類のキチン合成酵素の中で、最も重要と考えられるキチン合成酵素の 2 とキチン合成酵素 3 について、その機能を生化学的、分子生物学的な手法を用いて解析し、以下のような新知見を得た。

第 1 に、キチン合成酵素 2 のキチン合成反応触媒に関与する新しい機能ドメイン (Con2) を見出し、その中に触媒に関わる 4 つのアミノ酸残基 (His, Asp, Trp, Thr) を同定した。この新たに発見された機能ドメイン (Con2) は今まで知られているキチン合成酵素 1, 2, 3 すべてにおいて見出され、また上記 4 つのアミノ酸残基はどの酵素でもよく保存されていることから、全キチン合成酵素の活性中心を構成する重要なアミノ酸残基と考えられる。

第 2 に、この酵素活性の発現に重要な領域 (Con2 領域) に、さらにこの酵素を酵母細胞の出芽部位へ局在化させるシグナルとなるアミノ酸残基 (Thr) が存在することを明らかにした。この発見は酵素がその働く場所へ部位特異的に輸送される機構を明らかにする重要な発見といえる。

第 3 に、キチン合成酵素 3 の活性化に必須なコファクター (Chs4p) との相互関係を明らかにし、両者が結合することによりキチン合成酵素 3 の活性が発現し、さらに Chs4p の結合部位についても明らかにした。多くの研究者により、これまでキチン合成酵素 3 の活性化の因子として Chs4p が予想されていたが、本研究によりはじめて Chs4p がキチン合成酵素 3 と実際に結合し活性化をもたらしていることが証明された。

第 4 に、これまで真核生物では研究が進んでいなかったキチン合成酵素の基質となる UDP-GlcNAc を合成する UDP-GlcNAc ピロフォスホリラーゼをはじめ *S. cerevisiae*, *C. albicans* そしてヒトよりクローニングし、その触媒に関与するアミノ酸残基を同定した。

以上のように本研究はキチン合成に関与する酵素について従来は、遺伝子レベルでの研究が主であったところに、新しく遺伝子を発現させタンパク質レベルでの詳細な検討を加え上記のような新しい知見をもたらしたことで、キチン合成研究に重要な貢献をしたものと評価され、審査員一同、候補者は博士 (農学) の学位を授与されるに充分の資格を有すると認定した。